

소아과 : 제 43 권 제 3 호 2000

□ 원 저 □

SA14-14-2주 일본뇌염 약독화 생백신의 면역반응에 대한 연구

연세대학교 의과대학 소아과학교실, Department of Pathology,
University of Texas Medical Branch[†], Division of Vectorborne Infectious Diseases[□],
Center for Disease Control and Prevention

박민수 · 노혜옥* · 손영모 · Laura Chandler[†]
Robert Shope[†] □ Theodore F. Tsai^{□, †}

Immune Response to SA14-14-2 Live Attenuated Japanese Encephalitis Vaccine

Min Soo Park, M.D., Hye Ok Rho, M.D.^{*}, Young Mo Sohn, M.D.
Laura Chandler, M.D.[†], Robert Shope, M.D.[†] and Theodore F. Tsai, M.D.^{□, †}

*Department of Pediatrics, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea,
Department of Pathology, University of Texas Medical Branch[†], Galveston, TX, USA,
Division of Vectorborne Infectious Diseases[□], Center for Disease
Control and Prevention, Ft. Collins, CO, USA*

Purpose : SA14-14-2 live attenuated Japanese encephalitis(JE) vaccine has been administered safely and effectively to more than 100 million children in China since 1988, and recently licensure of the vaccine in Korea has been sought. Immune response to the vaccine was investigated.

Methods : In the first clinical evaluation of the vaccine outside of China, we monitored side effects in 93 children and evaluated plaque reduction neutralizing test(PRNT) antibody and IgM antibody responses to a single dose given as primary JE vaccination in 74 children, 1-3 years old (mean age 27 months).

Results : No significant adverse events were noted. PRNT antibodies(geometric mean titer [GMT] of 183) were produced in 96% of the 74 subjects. In 10 other children who previously had been immunized with two or three doses of inactivated JE vaccine, the booster administration of SA14-14-2 vaccine produced an anamnestic response in all, with a GMT of 3378. In a comparison group of 25 children previously immunized with two doses of inactivated vaccine, neutralizing antibody titers were detected in 16(64%). Viral specific IgM was detected in nine primary vaccinees(13%) but in others, IgM may have declined to undetectable levels in the four week postimmunization sample.

Conclusion : Live attenuated SA14-14-2 JE vaccine is a promising alternative to the only commercially available live attenuated JE vaccine for national childhood immunization programs in Asia. (*J Korean Pediatr Soc* 1999;43:351-359)

Key Words : Japanese encephalitis vaccine, Live attenuated SA14-14-2 vaccine, Inactivated Nakayama vaccine, Neutralizing antibody

* 현재 성균관대의 삼성제일병원 재직, † 현재 Wyeth Lederle
Vaccines and Pediatrics 재직
접수 : 1999년 6월 9일, 승인 : 1999년 10월 8일
책임저자 : 손영모, 연세의대 영동세브란스병원 소아과
Tel : 02)3497-3350 Fax : 02)3461-9473
E-mail : youngmo@yumc.yonsei.ac.kr

서 론

일본뇌염은 *Culex tritaeniorhynchus*에 의해 매개

되는 flavivirus 감염병으로 아시아 지역에서 발생하는 소아 뇌염의 대표적인 질환이다. 전세계적으로 매년 35,000명이 일본뇌염에 이환되어 5-30%의 치사율로 약 10,000명 이상이 사망하는 것으로 추정하고 있다¹⁾. 더욱이 회복되어도 이중 약 1/3은 신경계 합병증이 초래되어 영구적인 장애를 갖게 된다. 현재로는 일본뇌염 환자를 치료할 수 있는 뚜렷한 치료법이 없으므로 일본뇌염에 걸리지 않는 것이 최선의 방법이며 이를 위해 백신을 이용한 예방접종 사업과 개선된 새로운 백신을 개발하기 위한 연구가 지속되고 있다²⁾. 현재 상용화되어 있는 일본뇌염 백신은 모두 3종류로 이중 killed inactivated 백신이 2종류이고 live attenuated 백신이 1종류 있다. 불활화 사백신으로는 일본에서 개발한 마우스 뇌조직에서 배양한 백신(Nakayama와 Beijing 주)과 중국에서 개발한 햄스터 신장세포에서 배양한 백신(P-3주)이 있다. 약독화 생백신으로는 유일하게 중국에서 개발한 햄스터 신장세포에서 배양한 백신(SA14-14-2주)이 있다.

마우스 뇌조직 유래 불활화 사백신은 지난 20여년간 사용되어 왔지만 면역력 유지를 위해 다수의 추가접종이 필요하며, 유행시기 전에만 접종한다는 제한점이 있고, 복잡한 제조 공정, 다량 생산의 어려움, 높은 생산 원가 등으로 인하여 아시아의 많은 국가들이 예방접종 사업을 실시하지 못하고 있는 실정이다^{1, 2)}. 더욱이 마우스 뇌조직에 포함되어 있는 수초기저단백질(myelin basic protein)을 포함한 이종단백에 의한 중추신경계 부작용 및 기타 과민반응의 가능성과 관련된 안전성 문제와 장기 면역유지를 위한 추가접종 스케줄이 명확하지 않아 나라마다 접종방법이 상이하다는 점 등도 해결해야 할 문제로 남아있다. 국내에는 1971년부터 마우스 뇌조직 유래 사백신(Nakayama 주)이 생산되면서 1994년까지 모든 소아를 대상으로 3세부터 시작하여, 15세까지 매년 접종을 시행하여 총 14회의 접종이 시행되었으나, 1994년 사백신 접종후 사망사고가 연속 발생하여 접종 횟수를 8회로 줄이게 되었다. 이를 계기로 일반인들의 일본뇌염 예방접종 기피현상이 발생하였으며 예방접종 국가피해보상제도가 마련되었고 아울러 일본뇌염 예방접종 방법의 개선에 대한 논의가 시작되었다.

본 연구는 최근 일본뇌염 발생이 줄어든 상태에서 과다한 추가접종으로 야기될 수 있는 백신 부작용과 관련된 사망과 기타 건강상 피해를 줄일 수 있는 좀

더 안전하며 효과적인 예방접종 방법을 모색하기 위하여 1988년부터 중국에서 사용하고 있는 SA14-14-2 백신의 면역반응을 한국인 소아를 대상으로 조사하였다. SA14-14-2 백신은 현재 중국에서 매년 3,000만 도즈가 생산되고 있으며 현재까지 약 1억명 이상의 소아들이 접종하였고 최근 야외 임상, 무작위 코호트 연구를 통해 백신 접종자에서 특이할 만한 부작용 사례가 없었으며 97.5% 이상의 백신 효능이 보고 되었다³⁾. 본 연구는 1-3세 소아를 대상으로 SA14-14-2 약독화 생백신을 1회 접종하고, 중화항체를 통해 기본 면역반응 및 추가 면역반응을 알아보고 접종자에서 급성 부작용의 발생 여부를 관찰하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

임상시험 계획서는 연세의대 영동세브란스병원 임상시험 심사위원회(IRB)의 심사를 마친후 보건복지부 중앙약사심의위원회의 임상시험 실시 허가를 득한 후 실시되었다. 1997년 11월 1일부터 1998년 9월 30일까지 서울, 경기 지역에 소재하는 영유아 보호시설(chronic care facility)에 거주하는 소아와 연세의대 영동세브란스 병원 외래에 예방접종을 위하여 내원한 1-3세 연령층의 소아 등 모두 101명을 대상으로 하였다. 임상시험에 들어가기 전에 보호자에게 절차와 부작용을 설명하였고 부모나 또는 후견인으로 부터 동의서를 얻은 후 검사 및 접종을 시행하였다. 신체검사와 병력 조사상 제외기준에 해당하여 예방접종이 적합하지 못한 것으로 판단된 7명과 혈액 검사에서 간효소치가 높았던 1명을 포함 모두 8명이 제외되었다. 접종대상 포함기준에 해당하는 93명에 대한 이학적 검사와 혈액 검사가 시행되었고 아울러 SA14-14-2 백신을 접종하였다. 접종 4주후에 중화항체 검사를 위한 채혈을 다시 시행하였다. SA14-14-2 백신을 접종하기 전에 시행한 일본뇌염 바이러스 중화항체 검사에서 93명중 과거 일본뇌염 사백신 접종력이 확인된 소아 10명중 6명만이 양성반응을 보였다. 반면 과거 사백신 접종력을 확인할 수 없었던 6명에서도 양성 반응이 확인되었다. 백신 접종후 추적 검사에서 2명은 추적이 불가능하여, 접종 전 중화항체가 음성으로 판명되고 접종후 추적 혈액 검사가 가능하여 최종 면역원성 분석에 포함된 표본수는 74명으로 이들의 평균 연령은 26.8±6.6개월

이었고 남아가 43명이었다.

2. 백신 접종, 혈액 검사

접종 전 신체검사서에서 접종이 가능한 것으로 판단된 소아를 대상으로 혈액학적 검사 및 일본뇌염 항체 검사를 위한 채혈을 시행하였다. 혈액검사는 혈색소, 헤마토크릿, 백혈구, 혈소판, ALT 및 AST, 일본뇌염 중화항체 검사를 시행하였다. 접종한 일본뇌염 백신은 중국 위생부 성도생물제품연구소(Chengdu Institute of Biological Products, China)에서 제조한 일본뇌염 SA14-14-2 약독화 생백신(CD, JEVAX[□], lot 971050)으로 첨부된 용액에 용해하여 0.5ml를 왼쪽 삼각근 부위에 피하 주사하였다. 주사액에는 6.8 log₁₀/0.5ml PFU의 SA14-14-2주 일본뇌염 바이러스가 포함되어 있음을 중국 약품생물제품검정소(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products)로 부터 확인하였다. 접종 4주 후에 병력 및 신체검사를 통한 일반진료와 혈액학적 검사 및 중화항체가 검사를 위한 채혈을 실시하였다. 2회의 혈액채취는 피험자로부터 5ml를 채취한 후 2ml는 영동세브란스병원 임상병리과에서 혈액검사를 시행하였고 나머지 3ml의 혈액은 곧 혈청 분리되어 1.0ml cryovials에 0.5ml씩 분주하여 각 혈청 당 약 2-3개의 cryovials을 만든 후 freezer box에 넣어 -70℃ 냉동고에 저장하였다. 1인당 2회에 걸쳐 수집된 혈청을 cryovials에 담은 후 각각 무작위 번호가 기재된 라벨을 부착하였다. 혈청을 냉동상태로 검사실로 보내기 위하여 드라이아이스 20kg을 채운 스티로폴 용기에 넣어 미국 텍사스 대학의 WHO Collaborating Center for Tropical Disease(arbovirus) and the Center for Environmental Toxicology의 실험실에 국제 수송허가(PHS Permit No. FC-98-019)를 받아 항공편으로(DHL Shipment Airwaybill 2490489105, 2502789-914) 검체를 보낸 후 24시간 이내에 검체가 안전하게 도착했음을 확인하여 저장상태나 운송으로 인해 시험의 정확도가 감소하지 않도록 주의를 기울였다.

3. 플라그 감소 중화항체 검사법

플라그감소 중화항체 검사(plaque reduction neutralization test)는 Russel 등⁴⁾의 방법을 참조하였다. 중화항체 검사를 위해서 음성대조 혈청, 양성대조 혈청, 피험자의 혈청을 56℃에서 20분간 열처리하였다.

5% 우태아 혈청과 5% 기니아픽 혈청 및 PBS를 사용하여 피험자의 혈청을 1:5에서 1:5,120까지 2배수로 희석하였다. 일본 뇌염 바이러스 SA-14주를 200PFU/0.1ml로 희석한 후 0.1ml의 희석된 혈청을 0.1ml의 바이러스(200 PFU)에 첨가하여 혈청-바이러스 혼합액을 만들어 4℃에서 1일밤 배양하였다. 다음날 단층의 VE-RO 세포가 배양된 6 well plate에서 배양액을 제거한 후 0.1ml의 혈청-바이러스 혼합액을 각 well에 접종하였다. 대조 well에는 바이러스를 첨가하지 않은 혈청을 1:10으로 희석하여 넣었다. 플레이트를 매 15분마다 흔들어 주면서 1시간 동안 37℃에서 배양하였다. 접종액을 제거한 후 배양세포를 0.8% agarose가 첨가된 영양 배지에 옮기고 37℃에서 1주간 배양하였다. 이 시기에 접종 바이러스량을 측정하여 각 혈청당 정확한 PFU의 바이러스가 접종되었는지 확인하였다. 배양후 플라그를 50% 중화할 수 있는 최고 혈청 희석 배수를 피험자 혈청의 중화항체가로 결정하였다. 항체 양성 기준은 플라그 감소 중화적정법으로 측정하여 50% 플라그 감소를 기준으로 항체 역가(시험 혈청의 희석배수)가 1:10 미만인 경우 음성, 1:10 이상인 경우 양성으로 판정하였다.

4. IgM capture ELISA

1:100으로 희석된 혈청을 antihuman- μ chain 항체가 있는 96 well plate에 넣었다. 일본뇌염 바이러스(Nakayama 주) 또는 불활화 뇌조직 유래 항원을 대조군으로 하여 첨가한 후 효소가 부착된 antinflavivirus 항체와 substrate를 추가하였다. 반응후 흡광도를 측정하여 양성/음성 흡광도 비율이 2.0 보다 크면 IgM 항체 양성으로 판정하였다.

5. 부반응 조사

부반응조사는 즉각적 반응을 조사하기 위해 접종후 30분 이상 임상시험 담당의가 관찰하였고 부반응 조사서를 배부하여 접종후 3일간 발적, 종창, 경결, 국소통증, 소양감 등의 국소적 반응과 발열, 발진, 구토, 설사, 식욕부진, 기침, 보챔, 무기력감, 경련 등의 전신적 반응을 관찰하였고 접종후 4주간 1주 간격으로 부반응 발생 여부를 전화로 확인하였다.

결 과

1. 부반응 조사

백신 접종후 즉각적인 부반응 및 국소반응은 없었다. 이후 4주간 관찰 도중 전신 반응으로는 SA14-14-2 백신을 접종한 총 93례중 발열($37.5\sim 38^{\circ}\text{C}$) 7례(7.5%), 구토 1례(1.1%), 발진 1례, 식욕부진 1례, 보챔 1례가 보고되었다. 구토 및 식욕부진, 보챔의 증상이 있었던 경우 모두 정도가 경하였고, 치료 없이 1일 이내에 소실되었다. 발진이 있었던 1례는 접종 2일째부터 4일간 전신에 발진이 있었으며 그 외 발열, 보챔의 소견은 없었고 치료 없이 저절로 소실되었다.

2. 혈액 검사

CBC, ALT와 AST를 접종 전과 접종 4주후에 시행하였다. 접종후 혈액 검사상 이상 소견으로는 간 효소치 상승 1례(1.1%), 혈소판 감소증 1례가 있었다. 간 효소치는 접종 전에 ALT/AST가 57/44IU/L였으나 별다른 이상 소견 및 간 중대 소견 없어 접종을 시행하였으며 접종후 55/72IU/L로 AST가 약간 상승하였다가 2개월후 추적 검사상 정상화 되었다. 혈소판 감소증이 생겼던 1례의 피험자는 접종 전 혈액 검사상에 혈소판 수가 $148,000/\text{mm}^3$ 이었으며 접종 4주후 혈액검사상 혈소판수가 $53,000/\text{mm}^3$ 으로 떨어져 혈소판 감소증을 보였다가 1개월 추적 검사상 $138,000/\text{mm}^3$ 으로 회복되었다. 접종 전후 혈액 검사상 CBC, ALT, AST에는 의미있는 변화가 없었으나 혈소판수는 접종전 $340,219\pm 86,449/\text{mm}^3$ 에서 $295,121\pm 75,977/\text{mm}^3$ 정상범위 내에서 떨어지는 양상을 보였다.

3. SA14-14-2 백신의 초기 접종 중화항체 면역반응

생백신 접종전 사백신의 접종력이 없으며 중화항체 검사상 음성이었던 74명의 소아에서 일본뇌염 생백신 1회 접종 4주후 중화항체 양전률은 96% (71/74)였으며 양전된 소아들의 항체가 기하평균(geometric mean titer)은 183(130-261; 95% CI) 이었다(Fig. 1).

4. 불활화 사백신 접종력이 있는 소아에서 SA14-14-2 백신의 이차 면역반응

과거 일본뇌염 사백신 접종이 확인된 10명중 6명만이 SA14-14-2 백신 접종 전 중화항체가 양성으로 나

타났으며 GMT는 40(14-112; 95% CI)였다. SA14-14-2 백신 접종후에는 7,240(2,971-17,648; 95% CI)으로 113배 상승하였다. 사백신 접종력이 있으나 항체가 음성이었던 4명에서는 SA14-14-2 백신 접종후 5,120(564-46,482; 95% CI)으로 급상승하였다. 이들 10명을 함께 분석한 결과 접종후 GMT는 3,378 이었다. 사백신 접종 여부가 확인되지 않았던 6명에서는 접종 전 45(10-198; 95% CI)에서 접종후 905(96-8,519; 95% CI)로 역시 항체가가 상승하였다(Fig. 2).

5. 불활화 사백신의 중화항체 면역반응

예방접종 기록부에 의하여 1997년 또는 1996년에 처음으로 불활화 사백신을 2회 또는 3회 접종한 것이 확인된 소아 25명을 대상으로 PRNT 중화항체를 검사한 결과 16명에서만 중화항체가 확인되어 64%의 낮은 양성률이 관찰되었으며 GMT는 104였다. 이중 2명은 3회 접종을 하였는데 항체가가 1:40이었고 다른 한명은 음성 반응을 보였다.

6. IgM 항체 검사 결과

SA14-14-2 백신을 접종한 후 일본뇌염 바이러스 IgM 항체 검사는 접종자 74명중 68명에서 시행되었

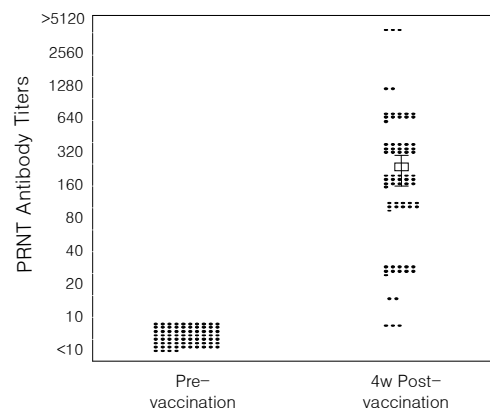


Fig. 1. Neutralizing antibody response to primary Japanese encephalitis(JE) vaccination with SA-14-14-2 live attenuated JE vaccine. 50% plaque reduction neutralization test (PRNT) titers are shown for each of the 74 subjects before and four weeks after vaccination. The geometric mean titer and 95% confidence intervals of the post-vaccination samples was 183(130-261). JE specific IgM antibodies were detected in nine vaccinees who had PRNT-titers of 10, 20, and 160(nine vaccinees).

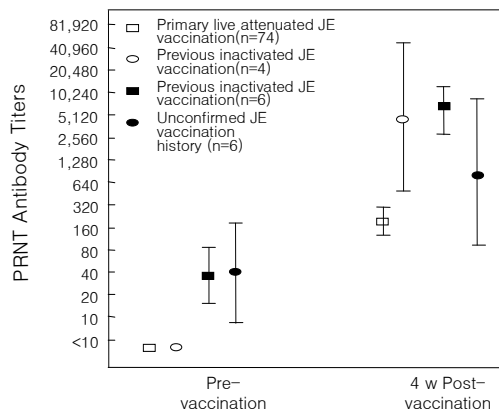


Fig. 2. Anamnestic response[50% plaque reduction neutralization test (PRNT) antibodies] to Japanese encephalitis (JE) vaccination using SA14-14-2 live attenuated JE vaccine. The respective geometric mean PRNT titers with 95% confidence intervals were (open circles, n=4) children with history of vaccination with inactivated JE vaccine but no pre-vaccination PRNT antibody: Pre-vaccination, <10 and post-vaccination 5,120(564-6,482); (closed squares, n=6) children with history of vaccination with inactivated JE vaccine and pre-vaccination PRNT antibodies: Pre-vaccination, 40(14-112) and post-vaccination 7,240(2,971-17,648); (closed circles, n=6) children with pre-vaccination JE antibodies and an uncertain vaccination history: Pre-vaccination 45(10-198) and post-vaccination 905(96-8,519); and for comparison, (open squares, n=74) children receiving SA14-14-2 vaccine as a primary JE vaccine: Pre-vaccination <10 and post-vaccination 183(130-261). Post-vaccination geometric mean PRNT titers were significantly higher in children previously immunized with inactivated JE vaccine than in primary vaccinees ($P < 0.001$, t -test).

다. 68명중 9명에서 양성 반응을 보여 13%를 나타냈다. 그러나 과거에 사백신 접종력이 있거나 생백신 접종 전 중화항체가 양성되었던 17명에서는 IgM 항체가 검출되지 않았다. 초기 접종자중 IgM 항체가 검출된 군의 PRNT 항체 GMT는 93이었고 검출되지 않았던 군은 205로 양군간의 통계학적 차이는 없었다($P > 0.05$, t -test).

고 찰

SA14-14-2 바이러스는 1954년 *Culex pipiens* 유충으로부터 분리한 SA 14 바이러스를 근원주(paren-tal strain)로 하여 햄스터 신장세포(PHK)에서 100대

계대 배양후 플라그 선택, 계대아 세포에서 클로닝을 시행한 후, 복강 및 경구접종에 의한 마우스와 햄스터 계대 배양을 거친 후 최종적으로 다시 PHK 세포에서 플라그 선택과정을 거쳐 약독화된 바이러스 주로 1988년 부터 중국에서 효과적으로 사용하고 있는 약독화 생백신이다¹⁾. 신경성 독력의 약독화 여부를 확인하기 위하여 SA14-14-2 바이러스를 마우스 뇌강내로 직접 주사한 결과 주위조직에 국한된 정도의 염증 조건만 관찰되었으며 바이러스의 증식 여부는 확인되지 않았으며 누드 마우스를 대상으로 복강 및 피하로 107 TCID₅₀ 이상의 바이러스를 투여하여도 사망하거나 조직 병리학적으로 이상 소견이 발견되지 않았다⁵⁻⁹⁾. 최근 Liu 등¹⁰⁾이 SA14-14-2 백신의 안전성에 대한 무작위 코호트 연구를 통하여 1-2세의 소아 26,239명을 대상으로 백신 접종후 부작용을 조사한 결과 마우스 뇌조직 유래 백신에서 나타나는 경련, 뇌중, 안면 부종이나 두드러기 같은 과민반응 등이 관찰되지 않았으며 백신 접종후 나타나는 일반적인 증상인 발열 4.9%, 보챔 3.8%, 기침 3.4%, 발진 2.2%, 구토 1.1% 등도 대조군과 차이가 없음을 보고하였다. 면역원성 임상시험에서는 바이러스 감염 도즈가 5.5 log₁₀PFU/ml 이하인 경우 항체 양전률이 85%, GMT 23-46으로 다소 낮아 SA14-14-2 바이러스가 과도하게 약독화된 것으로 판단하여 최소한의 바이러스 감염 도즈를 6.0 log₁₀ PFU/ml(10^{6.7} TCID₅₀/ml)를 유지하도록 하여 면역원성을 개선하였다¹¹⁾. 중국 보건 당국은 중국내에서 진행된 임상자료에 의하여 유행 지역 또는 비유행 지역을 모두 포함한 면역원성에 대한 결과들이 다양하고, 일본뇌염 발생을 억제하는 것이 시급한 상황이라는 점 등이 고려되어, SA14-14-2 백신을 1회만 접종하여도 95% 이상의 질병 방어효과가 있었다는 보고가 있음에도 불구하고 2회 접종 방식(1년 간격 추가접종)을 계절에 따른 접종 사업을 시행하고 있다¹²⁾. 최근 발표한 Hennessy 등³⁾의 조사에 의하면 1회 접종후 질병 방어율이 80%, 2회 접종에서 98%를 보인 것으로 나타났으나 실제 1회 접종후 방어율은 더 높을 것으로 예상되어 추후 좀더 광범위한 조사가 필요하다¹³⁾.

현재 국내에서 사용되고 있는 일본에서 개발된 마우스 뇌조직 유래 불활화 사백신(Nakayama주 또는 Beijing주)은 현재 유일하게 국제적으로 사용되는 백신이며 그 효능은 태국과 대만에서 1965년, 1984년 두 차례 시행한 야외 실험결과에 의하면 최소한 2차례 이

상 접종한 경우 기본접종 2년후의 방어 효능은 55-91% (39-98%; 95% CI)이며 추가접종이 지속적으로 필요한 것으로 나타나 있다¹⁴⁻¹⁷⁾. 이 백신은 한국, 일본, 대만, 태국 등을 비롯하여 아시아 국가에서 소아를 대상으로 접종되고 있으며 최근 미국 FDA에서 이 백신이 허가된 이후 미국, 유럽 국가들에서는 일본뇌염이 유행하는 지역으로 장기간 여행하거나 거주하는 경우가 이 백신을 추천하고 있으나 마우스 뇌조직 유래 일본뇌염 백신에 대해서는 다음과 같은 문제점들이 지적되고 있다. 첫째, 1990년 이후 미국 및 유럽 국가에서 성인을 대상으로 접종하기 시작한 후 보고되기 시작한 여러 증상들에 대한 규명이 필요하다. 미국에서 실시된 백신 허가전 임상 시험결과와 시판 후(postlicensure) 조사결과에 의하면 심각한 과민반응으로 전신 두드러기나 안면부종이 접종자의 0.5%에서 나타났으며 이러한 부작용 비율은 현재 임상적으로 사용되고 있는 기타 다른 백신의 부작용 빈도와 비교할 때 부반응률(reactogenicity)이 상당히 높은 편이다^{18, 19)}. 이러한 이유에서 미국이나 기타 유럽국가들은 매우 제한적인 접종을 권고하고 있는 실정이다. 특정 군요원이나 위험지역으로 여행하려는 사람에게만 권장하며 일반적인 여행에는 권장하지 않고 있다²⁰⁾. 더욱이 최근 시간적 연관성이 있는 급성 범발성 뇌수막염(ADEM)의 발생으로 백신 접종과 연관된 중추신경계 부작용의 위험성에 대하여 관심이 모아지고 있다. 현재까지 보고된 중추신경계 부작용의 위험도에 대한 자료는 분석하기가 어렵지만 최근의 분석에 의하면 1/100,000 doses로 나타났²¹⁻²⁴⁾. 둘째, 생물학적으로 마우스 뇌조직 배양으로 만들어지는 백신을 용인하는 데는 제한적일 수밖에 없다는 점이다. 생산 과정 중 마우스 뇌 조직 잔여 기질들을 제거하기 위하여 미국과 일본에서는 MBP의 잔여 허용치를 2ng 이하로 제한하고 있지만 최대한 정제를 하여 만든 백신이라 하여도 이를 silver-stained electrophoretic gels로 처리하여 확인해 보면 많은 불특정 단백질 띠가 나타나는데 이들의 상당수는 마우스 뇌조직에서 유래한 것으로 판단되고 있다²⁵⁾. 셋째, 백신 제조 공정이 복잡하고 제조원가가 비싸 아시아 개발도상국가에서 매년 7천만명의 소아(birth cohort)에게 필요한 대량 생산이 어렵다는 것이 이 백신을 용이하게 사용할 수 없는 한계점으로 지적되고 있다. 이러한 배경에서 1996년 세계보건기구의 백신 연구개발계획에 의하면 안전하고 효과적이며 경제적인 새로운 백

신의 개발을 위하여 flavivirus의 protective antigenic determinants를 증명하고, 체액성 및 세포 매개성 면역반응에 대한 정의를 내리고 mutant and chimeric vaccine제조를 위한 infectious clones을 개발하며, 생물 벡터를 이용한 백신 개발, recombinant peptide subunit vaccines and naked DNA vaccine에 대한 연구 등이 진행 중에 있으며 좀더 실질적인 연구로는 현재 사용중인 사백신과 중국에서 사용되는 생백신을 포함하여 백신의 효능과 안전성 평가, 임상시험에 필요한 질병 발생 분포에 대한 역학 연구, 신속 간편한 진단법 개발 등에 대한 연구를 지원하고 있다²⁾.

SA14-14-2 백신은 현재 중국내에서만 사용되고 있지만 마우스 뇌조직 유래 사백신보다 효과나 안전성 면에서 우수하고 백신 접종 비용면에서도 매우 유리한 장점을 인정 받고 있다. 이번 국내에서 사용된 백신 (lot, 971050)은 중국 성도생물제품연구소(Chengdu Institute of Biological Products, Chengdu, China)에서 생산되었으며 중국 National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products(NICBP, Beijing, China)에서 바이러스 감염 역가를 재확인하였을 뿐만 아니라 미국 Tektagen 연구소(Tektagen Co, Philadelphia, USA)에서 dual template method로 re-trovirus 오염 여부를 검사한 결과 음성임이 확인되었다. 본 임상시험은 중국 이외의 국가에서 처음으로 검증된 1-3세를 대상으로 한 중화항체 면역원성에 대한 연구결과로 그 결과는 이전의 임상시험 결과와 일치하는 1회 접종으로 96.9%의 중화항체 양전률을 보였으며 이는 중국에서 이전에 시행된 면역원성 결과와 일치함을 확인하였다. 접종후 중화항체 역가의 기하평균(geometric mean titer)은 183.4로 나타나 이전의 임상 결과들보다 높게 나타났으나 이는 아마도 PRNT 검사 방법이나 역가 계산 방법의 차이에 기인한 것으로 추측되며^{1, 12, 13)}, SA14-14-2 백신 접종후 PRNT 역가는 flaviviruses 약독화생백신인 17D yellow fever (YF) 백신의 결과와 유사하다.

96년 또는 97년에 처음으로 Nakayama주 사백신을 2회 접종한 사실이 확인된 10명의 소아를 대상으로 SA14-14-2 생백신을 접종한 결과 10명 모두 매우 높은 중화항체 반응을 확인할 수 있었다. 더욱이 이들 10명중 SA14-14-2백신을 접종하기 전에 이미 중화항체를 갖고 있었던 6명의 소아는 SA14-14-2백신 접종 전 GMT 40(14-112; 95% CI)에서 접종후 7,240

(2971-17,648; 95% CI)로 급격한 상승을 보여 추가 접종 효과를 확인 할 수 있었다(Fig. 2). 뿐만 아니라 생백신 접종 전에 확인한 중화항체 검사에서 1:10 미만의 음성 반응을 보인 4명에서 생백신 접종후 중화항체 GMT 3044로 사백신을 접종한 적이 없는 소아의 GMT 183와 비교할 때 통계적으로 의미있는 차이를 보였다($P < 0.01$). 이러한 현상은 모든 소아에서 일률적으로 관찰되어 분명한 이차 면역반응인 anamnestic immune response 있음을 나타내는 것으로 사료되었다. 이는 이미 사백신으로 partially immunized된 소아에서 생백신을 접종하는 경우 2차 면역반응이 유도되기 전에 백신 바이러스가 제거될지도 모른다는 우려를 불식시킬 수 있는 결과로 판단된다. 또한 이전에 사백신을 접종하였으나 중화항체가 검출되지 않는 개체에서도 생백신을 접종한 후에 역시 아주 높은 PRNT 역가를 보이는 것을 보면 T 세포의 기억반응에 의하여 체액성 면역반응이 유도되고 있음을 추측할 수 있다.

이번 임상시험에서 SA14-14-2를 접종하지 않았지만 이전에 사백신을 2회 접종이 확인된 소아에서 중화항체 양성율이 64%로 나타났다. 물론 이 결과는 전향적인 검사가 아니고 후향적인 검사임을 감안하여야 하며 혈청 채취시기가 접종후 7개월이 지난 시점이고 공격주 바이러스가 SA14주 임을 감안하여야 하지만, 사백신 2회 접종후 면역원성이 45-67%로 낮게 나타나 1달에 3회 접종을 기본 접종으로 권장하는 미국의 접종 방식을 유념해 보아야 할 것이다. 그러나 한편으로는 사백신 접종후 중화항체가 검출되지 않았던 소아에서도 SA14-14-2 백신 접종으로 면역 기억반응으로 인해 높은 항체가의 상승을 보인 것으로 유추해 보면 2회 접종으로 항체 양전율이 낮아도 실제 자연 상태에서 일본뇌염바이러스에 감염되어도 병에 걸리지 않을 것이라는 예측을 가능케 한다. SA14-14-2 백신 1회 접종만으로 95% 이상의 방어율을 기대할 수 있는 근거로 일본뇌염이 유행하는 지역에서 99% 이상이 무증상인 빈번한 자연감염의 기회가 백신의 면역반응을 보강할 수 있을 것이라는 점이다. 그러므로 Hennessy 등³⁾의 최근 임상연구에서 1회 접종의 방어율이 80%로 나타났지만 조사대상 표본수가 적은 것을 감안하여 95% 신뢰구간으로 보면 40-93%로 나타나 충분한 표본을 대상으로 다시 조사하여야 할 것이다.

일본뇌염 특이 IgM 항체는 SA14-14-2 접종이 초회 접종인 소아의 13%에서 검출된 것은 아마도 백신

접종 4주후에 검사를 하였기 때문에 상당수에서 IgM 항체의 역가가 낮아 검출되지 않은 것으로 믿어진다. 또한 이전에 사백신을 맞거나 자연감염으로 인한 중화항체가 검출된 11명의 소아에서 SA14-14-2 백신 접종후 모두 IgM 항체가 검출되지 않았다는 점, 면역기억반응으로 높은 항체가 상승을 보인 소아들에서도 IgM 항체가 음성이라는 점, 국내에서는 최근 일본뇌염 바이러스 감염이 아주 낮은 지역이라는 점 등을 고려할 때 표본수가 너무 적어 결론을 내릴 수는 없지만, SA14-14-2 백신 접종후 높은 항체가 상승은 역시 SA14-14-2 백신에 의한 이차 면역반응이라는 사실을 뒷받침하는 것으로 볼 수 있다. YF 17D 백신에서 YF 바이러스 항체를 검사하기 위하여 Asibi 주를 사용했을 때 실제 자연계에서 분리한 야생주를 공격바이러스로 사용했을 때 보다 항체가가 높게 측정된다는 점을 감안한다면 본 연구의 PRNT 검사시 바이러스 공격주로 SA14주를 사용한 것이 높은 항체가를 보일 수 있는데 대한 일부 영향이 있었을 것으로 볼 수 있다. 한편 SA14-14-2, SA 14 parent, Nakayama, Beijing, P3 그밖에 아시아 지역에서 순환하는 바이러스중 유전자 분석이 된 모든 일본뇌염 바이러스중 어느것도 유전자형이 다른 일본뇌염에 감염되어 병을 일으켰다는 증거는 없다⁸⁾.

국내에서 사용되는 마우스 뇌조직 유래 사백신 제조 규정에는 MBP에 대한 최소 함량 규정이 없다. 또한 백신의 안전한 품질을 보장하기 위해서는 고도로 통제된 건강한 마우스의 사육, 수송, 공급인 점을 감안할 때 이 부분에 대한 안전성의 확보를 보장할 수 있을지 의문이며 바로 이 부분이 백신의 가격에 가장 큰 영향을 미치는 것이다. 그 밖에도 마우스를 바이러스로 감염 시킨 후 뇌를 추출, 프로타민 처리, ultrafiltration, 농축, salting out, ultracentrifugation, dialysis 등의 복잡한 원료제조 과정 등이 백신 생산 관리 규정을 만족시키고 있는지도 의문이다. 일본뇌염 예방접종은 해당 연령이 되면 정기적으로 접종하지 않고, spring campaigns에만 접종하는 계절식 방법을 사용하고 있으며 아직도 15세까지 8회 이상의 많은 추가 접종을 하여야만 하는 실정이다. 한편 약독화 생백신 SA14-14-2주(씨디제박스)를 1회 접종한 후 PRNT법으로 측정한 본 연구의 면역원성 조사에서 95.9%의 중화항체 양전률과 높은 중화항체가가 확인되어 1회 접종 만으로도 충분한 방어효과를 기대할 수 있을 뿐

만 아니라 이전에 사백신을 접종한 경우에는 1회 접종만으로 장기면역을 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

현재 국내에서 사용하는 동일한 일본뇌염 사백신을 주변 국가에서는 접종 방식에 차이가 있다. 일본의 경우 기본 초회 접종을 6-90개월 사이에 접종하고 이후 2회의 추가접종(9-12세, 14-15세)을 하고 있으며 대만의 경우 15-27개월, 태국의 경우 18-24개월에 각각 초회 접종을 한후 1회의 추가 접종(대만 6세, 태국은 7세)을 하고 있다. 초회 접종 시기의 결정은 모체로부터의 수동면역 소실 시기와 일본뇌염에 이환될 수 있는 연령에 의하여 결정하여야 하기 때문에 3세 이후부터 접종하는 방법은 사실상 바람직하지 않다. 그 근거로 과거 일본 뇌염 발생이 많았던 시기에는 일본이나 한국에서 1-3세의 환자 발생이 있었다. 아마도 이러한 결정은 사백신을 개발한 일본에서는 사백신의 중추신경계 부작용에 대한 고려때문에 3세부터 접종하고 일본뇌염이 유행하는 지역에서만 생후 6개월부터 접종하는 방식을 그대로 국내에 적용하였고 당시 국내에서 3세 미만에서 환자 발생이 없었음을 강조하여 지금까지 접종하고 있는 것으로 생각된다. 그러나 현재 일본은 6-90개월로 접종시기를 상당히 유동적으로 넓혔으며 Nakayama 주를 사용하지 않고 있다. 또한 추가접종 방식도 국내에서처럼 매 2년마다 시행하는 정기적 간격의 추가접종을 하지 않고 있다.

1985년 국가예방접종 사업이 도입되면서 우리나라는 일본뇌염 추가접종 방법을 결정함에 있어서 항체를 지속적으로 유지하기 위해서는 매년 접종이 필요하다는 근거에서 추가접종을 하여왔다. 이러한 추가접종 방식은 외국의 접종 방법과 의학적, 면역학적 검토로 비추어 볼 때, 과도한 추가접종을 시행한 것으로 판단된다. 매년 약 4-5백억원의 의료비가 지출되었으며 현재까지 일본뇌염 사백신 추가 접종을 위한 비용은 수천억원의 의료비 부담으로 이어져 왔다. 뿐만 아니라, 과도한 사백신 접종으로 인한 부작용도 상당수 발생하였을 것이며 결국 이러한 상황은 의학적으로나 의료비의 효율적 이용이라는 사회경제적 측면에서 볼 때 매우 비합리적인 예방접종 사업이었던 것으로 사료된다. 향후 개선된 일본뇌염 백신들은 12개월 이후에 접종하는 것이 바람직하며 만약 국가예방접종 사업에 도입되는 경우 MMR 접종시기와 함께 고려되어야 하는 것이 타당할 것이다.

결론적으로, 일본뇌염 발생이 거의 없는 최근의 한국 실정을 감안한다면 좀더 안전하고 간편하며 경제적인 예

방접종에 대하여 연구 개선하여야 할 시기로 사료된다.

요 약

목 적 : 생후 1세에서 3세의 건강한 소아를 대상으로 일본 뇌염 생 바이러스 백신을 투여하여 중화항체 면역반응과 부작용 발생 여부를 평가한다.

방 법 : 1-3세의 소아 93명(평균연령 27개월)을 대상으로 신체검사 및 혈액검사를 시행후 SA14-14-2 일본뇌염 생백신(CD-JEVAX, Chengdu Institute of Biological Products, lot 971050) 0.5ml(5.4log PFU 이상)를 왼쪽 삼각근 부위에 피하 주사하였다. 접종 4주후에 혈액학적검사 및 중화항체가 검사를 위한 채혈을 실시하였다. 플라그 감소 중화항체 검사법의 양성 기준은 50% 플라그 감소를 기준으로 시험 혈청 희석 배수가 1:10 미만인 자를 음성으로, 1:10 이상인 자를 양성으로 판정하였다. 접종후 1개월간 접종 부반응을 조사하였다.

결 과 : 과거에 사백신을 접종한 적이 없으며 중화항체가 음성인 74명에서 SA14-14-2 백신 접종후 양전률은 96%(71/74)였으며, GMT는 183이었다. 과거 일본뇌염 사백신 접종력이 있거나 접종력이 없어도 중화항체가 양성이었던 17명에서는 생백신 접종후 GMT가 3378로 높은 항체 상승을 보였다. 불활화 사백신을 접종한 대조군 25명에서는 64%(16/25)에서 중화항체가 발견되었다. IgM 항체는 13%(9/68)에서 나타났다. 부반응 조사에서 특이할 만한 과민반응이나 부작용 발생은 없었으나 혈액 검사 이상소견으로는 간 효소치 상승 1례와 혈소판 감소증 1례가 있었으나 추적 검사상 정상화 되었다.

결 론 : SA14-14-2 백신의 1회 접종후 기본 면역반응은 우수하며 기존의 사백신 접종자에서도 이차면역반응이 확인되어 추가접종 효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 보란제약의 임상연구비로 이루어졌으며 사용된 백신의 역가 측정과 중화항체 검사에 협조해 준 중국 National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products(NICPBPP)와 Texas University, WHO Collaborating Center for Tropical Disease의 검사실에 감사를 포함합니다.

참 고 문 헌

- 1) Tsai TF, Chang GJ, Yu YX. Japanese encephalitis vaccines. In: Plotkin SA, Orenstein WA, editors. *Vaccines*. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Co, 1999:672-710.
- 2) Cambers TJ, Tsai TF, Pervikov Yuri, Monath TP. Vaccine development against dengue and Japanese encephalitis: Report of a World Health Organization meeting. *Vaccine* 1997;15:1494-1502.
- 3) Hennessy S, Zhengle L, Tsai TF, Strom BL, Wan CM, Liu HL, et al. Effectiveness of live-attenuated Japanese encephalitis vaccine(SA 14-14-2): A case-control study. *Lancet* 1996;347:1583-6.
- 4) Russel PK, Nisalak A, Sukhachana P, Vivona S. A plaque reduction test for dengue virus neutralizing antibodies. *J Immunol* 1967;99:285-90.
- 5) Hase T, Dubois DR, Summers PL, Downs MB, Usery MA. Comparison of replication rates and pathogenicities between the SA 14 parent and SA 14-14-2 vaccine strains of Japanese encephalitis virus in mouse brain neurons. *Arch Virol* 1993;130:131-43.
- 6) Yu YX, Wang JF, Zheng GM, Li HM. Response of normal and athymic mice to infection by virulent and attenuated Japanese encephalitis viruses. *Chin J Virol* 1985;1:203-9.
- 7) Hoke CH, Nisalak A, Sangawhipa N, Jatanasen S, Laorakapongse T, Innis BL, et al. Protection against Japanese encephalitis by inactivated vaccines. *N Engl J Med* 1989;319:609-14.
- 8) Ni H, Barrett AD. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the structural protein genes of Japanese encephalitis viruses from different geographical locations. *J Gen Virol* 1995;76:401-7.
- 9) Yu YX, Wu PF, Ao J, Liu LH, Li HM. Selection of a better immunogenic and highly attenuated live vaccine virus strain of JE. I. Some biological characteristics of SA 14-14-2 mutant. *Chin J Microbiol Immunol* 1981;1:77-84.
- 10) Liu ZL, Hennessy S, Strom BL, Tsai TF, Wan CM, Tang SC, et al. Short-term safety of live attenuated Japanese Encephalitis vaccine(SA14-14-2): Results of randomized trial with 26,239 subjects. *J Infect Dis* 1997;176:1366-9.
- 11) Ao J, Yu XY, Wu PF, Li HM, He SM, Jia RZ. Studies on the variation of Japanese encephalitis virus. VII. An observation on persistence of immunity in children inoculated with JE attenuated live vaccine(SA14-5-3 mutant). *Wei Sheng Wu Hsueh Pao* 1981;21:501-5.
- 12) Yu YX, Ming AG, Pen GY, Jain AO, Min LH. Safety of a live-attenuated Japanese encephalitis virus vaccine(SA 14-14-2) for children. *Am J Trop Med Hyg* 1988;39:214-7.
- 13) Tsai TF, Yu YX, Jia LL, Putvatana R, Ran Z, Shouhui W, Halstead SB. Immunogenicity of live attenuated SA 14-14-2 Japanese encephalitis vaccine—a comparison of 1-and 3-month immunization schedules. *J Infect Dis* 1998;177:221-3.
- 14) Rojanasuphot S, Charoensook O-A, Ungchusak K, Srijagrawalwong A, Panthumachinda B. A field trial on inactivated mouse brain Japanese encephalitis vaccines produced in Thailand. *Mosquito-Borne Dis Bull* 1991;8:11-6.
- 15) Okuno T, Tseng PT, Hus ST, Huang CT, Kuo CC, Lin SY. Japanese encephalitis surveillance in China (Province of Taiwan) during 1958-1971. II. Age-specific incidence in connection with Japanese encephalitis vaccination program. *Jpn J Med Sci Biol* 1975;28:255-67.
- 16) Gambel JM, DeFraitres R, Hoke C, Brown A, Sanchez J, Karabatsos N, et al. Japanese encephalitis vaccine: Persistence of antibody up to 3 years after a three-dose primary series. *J Infect Dis* 1995;171:1074.
- 17) Juang FR, Okuno Y, Fukunaga T, Tadano M, Fukai K, Baba K, et al. Neutralizing antibody responses to Japanese encephalitis vaccine in children. *Biken J* 1983;26:25-34.
- 18) Berg SW, Mitchell BS, Hanson RK, Olafson RP, Williams RP, Tueller JE, et al. Systemic reactions in US Marine Corps personnel who received Japanese encephalitis vaccine. *Clin Infect Dis* 1997;24:265-6.
- 19) Plesner AM, Soborg PA, Herning M. Neurological complications and Japanese encephalitis vaccination. *Lancet* 1996;348:202-3.
- 20) Immunization Practices Advisory Committee (ACIP). Inactivated Japanese encephalitis virus vaccine: Recommendations of the ACIP. *MMWR* 1993;42(RR-1):1-15.
- 21) Plesner AM, Ronne T. Allergic mucocutaneous reactions to Japanese encephalitis. *Vaccine* 1997;15:1239-43.
- 22) Nazareth B, Levin J, Johnson H, Begg N. Systemic allergic reactions to Japanese encephalitis vaccines. *Vaccine* 1994;12:666.
- 23) Poland JD, Cropp CB, Craven RB, Monath TP. Evaluation of the potency and safety of inactivated Japanese encephalitis vaccine in U.S. inhabitants. *J Infect Dis* 1990;161:878-82.
- 24) Ruff TA, Eisen D, Fuller A, Kass R. Adverse reactions to Japanese encephalitis vaccine. *Lancet* 1991;338:881-2.
- 25) Tsai TF. Inactivated Japanese encephalitis virus vaccine—recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices(ACIP). *MMWR* 1993;42(RR-1):1-15.
- 26) Monath TP. Yellow fever vaccine. In: Plotkin SA, Orenstein WA. editors. *Vaccines*. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Co. 1999:815-79.